DISSERTATIONS-AUSZUG

Über die Inhaltsstoffe von Simaba cedron Planch.

Auszug aus der Inaugural-Dissertation desselben Titels
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

vorgelegt von

Heinz Ernst Rüber

geboren am 11. 11. 1932 in Cartagena, Col. S.A.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 1960

Dekan: Professor Dr. Hubert Krüger

1. Berichterstatter: Professor Dr. Karl Günter Krebs

2. Berichterstatter: Professor Dr. Walter Hückel

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Ein Exemplar der vollen Dissertation in Maschinenschrift und ein Kleinfilmnegativ und -positiv (Format 24×36 mm) befinden sich in der Universitätsbibliothek in Tübingen. Der Positivfilm kann in der Universitätsbibliothek benutzt werden. Auf Wunsch gibt die Universitätsbibliothek Positivkopien zu dem jeweils gültigen Kostensatz ab.

6607

A. Besprechung der bisherigen Veröffentlichungen.

Nach der bisher vorliegenden Literatur enthielten die Samen von Simaba cedron Pl. einen anscheinend glykosidischen Bitterstoff, der von den früheren Autoren nur in mehr oder weniger reiner Form erhalten wurde. Der Bitterstoff wurde von LEWY [1]) Cedrin und von TANRET [2]) später Valdivin genannt. In klinischen Versuchen am Menschen wiesen NAUCK und PICADO [3]) die Wirksamkeit von unreinem Cedrin gegen die Schizonten der Malaria tertiana und der Malaria tropica nach. Über die Konstitution des Cedrins war nur bekannt, daß es sich um ein Glykosid handeln sollte. Verschiedene Summenformeln wurden genannt. Als weitere Inhaltsstoffe der Samen von Simaba cedron wurden Fett, Eiweißstoffe und Stärke genannt, sowie der in Simarubaceen häufig vorkommende Bitterstoff Quassiin.

Über Verfälschungen der echten Cedronsamen berichteten HARTWICH [4]), TANRET [2]) und CUATRECASAS [5]). Für die aus Columbien gelieferten geschälten Samen von Simaba cedron Pl. kommt jedoch nur die Verwechslung mit den Samen der Cedronia granatensis Cuatr. in Frage. Beide Arten werden in Columbien von den Eingeborenen „Cedron" genannt.

B. Eigene Untersuchungen.

1. Isolierung des Bitterstoffes Cedrin.

Die pulverisierten und mit Petroläther entfetteten Cotyledonen wurden mit Äthanol/Chloroform (3/2 Volumenteile) extrahiert. Der Extrakt wurde eingedampft und der Rückstand mit siedendem Wasser aufgenommen. Das wässerige Filtrat wurde mit gesättigter Bleiazetatlösung versetzt. Dann wurde nach der von HERISSEY [6]) beschriebenen Methode zur Entfernung überschüssigen Bleiazetats mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und Kalziumkarbonat zugefügt. Nach einigem Stehen wurde die entstandene Masse getrocknet und alsdann mit Äthylazetat erschöpfend extrahiert. Das Ende der Extraktion ist daran zu erkennen, daß die ablaufende Flüssigkeit keine grüne Fluoreszenz mehr zeigt, und daß der Tüpfeltest mit Triphenyltetrazoliumchloridlösung [7]) negativ ausfällt. Der Äthylazetatextrakt wurde eingedampft und der Rückstand in siedendem Äthanol gelöst. Nach mehrtägigem Stehen schied sich Cedrin in gelben Krusten allmählich ab. Nach Umkristallisieren aus Äthylazetat, Äthanol sowie Methanol erhielt man weiße rhomboedrische Kristalle. Schmelzpunkt 266°; Ausbeute: 0,037 %.

---

1) M. LEWY, Compt. rendus, **32**, 510 (1851).
2) Ch. TANRET, Compt. rendus, **91**, 886 (1880/2).
3) E. NAUCK, E. PICADO, Archiv f. Schiffs- u. Tropenhygiene, **34**, 29 (1930).
4) C. HARTWICH, Arch. Pharm., **223**, 249 (1885).
5) J. CUATRECASAS, Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales, VIII. (n. 31), 302 (1951).
6) H. HERISSEY, Journ. Pharm. Chim., **16**, 513 (1932) zit. n. K. PAECH, M. V. TRACEY, Moderne Methoden d. Pflanzenanalyse, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955) Bd. II, S. 309.
7) F. CRAMER, Papierchromatographie, 4. Aufl., Verlag Chemie Weinheim (1958), S. 118.

2. Untersuchung des Bitterstoffes Cedrin.

Mit der Probe auf Glykoside nach FREHDEN und GOLDSCHMID [8]) wurde der Nachweis einer Zuckerkomponente im Cedrin versucht. Da die Probe negativ ausfiel, war die glykosidische Struktur des Cedrins unter Berücksichtigung der großen Empfindlichkeit der Reaktion bereits erheblich in Frage gestellt. Zur „Hydrolyse" wurde Cedrin mit 12,5 %iger Salzsäure erhitzt. Aus der anfangs klaren, gelben Lösung des Cedrins schieden sich allmählich rotbraune Flocken ab. Das Filtrat wurde nach dem Neutralisieren auf Zucker geprüft. Im eingedampften Filtrat war nach dem Chromatographieren kein Zucker mit Anilinphthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid/NaOH [9]) nachzuweisen. Somit kann eine glykosidische Struktur des Cedrins ausgeschlossen werden.

Das rotbraune wasserunlösliche Reaktionsprodukt der Säurebehandlung reagierte neutral, war geschmacklos und zersetzte sich bei 210 °. Die methanolische Lösung färbte sich mit Eisenchloridlösung dunkel. Mit tetrazotiertem Benzidin, mit Nitrazol CF extra, mit Echtrot B-Salz und mit Echtblau B zeigte die Substanz intensive Färbungen, wie sie für Phenole typisch sind.

Cedrin ergab nach dem Behandeln mit alkoholischer Hydroxylamin-HCl-Lösung und alkoholischer KOH beim Ansäuern mit Salzsäure nach Zugabe von Eisenchloridlösung eine violette Färbung, wie sie für Eisenhydroxamate charakteristisch ist. Cedrin zeigte beim Versetzen mit Kalilauge und Zurücktitrieren keinen Alkaliverbrauch. Nach halbstündigem Kochen mit alkoholischer Natronlauge konnte ein Alkaliverbrauch gemessen werden, der einem Gehalt von 15 % (14,3 %) Carboxyl oder einem Äquivalentgewicht von 300 (294) entsprach. Da die Molekulargewichtsbestimmungen für Cedrin einen Wert von 306 ergab, stimmen die Werte der Titration damit gut überein. Cedrin wurde nach der Behandlung mit äthanolischer Natronlauge in der Hitze mit einem Überschuß an Säure versetzt und nach dem Erkalten wieder mit NaOH zurücktitriert. Dabei wurde ein Alkaliverbrauch gemessen, der einem Gehalt von 8,09 % (8,5 %) Carboxyl entsprechen würde. Da dieser Wert zu tief liegt, kann das Vorliegen eines Esters im Cedrin ausgeschlossen werden. In Verbindung mit der IR- und UV-Absorption des Cedrins darf als sicher angenommen werden, daß Cedrin eine Laktongruppe im Molekül enthält.

Cedrin zeigte im IR-Bereich bei Frequenzen von 1770 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} starke Absorption. Für Santonin wurde ebenfalls ein Maximum bei 1770 cm^{-1} und ein weiteres bei 1650 cm^{-1} gefunden, während für Cumarin Maxima bei 1695 cm^{-1} und 1588 cm^{-1} gemessen wurden. Im UV-Bereich zeigen ungesättigte Laktone gewöhnlich starke Absorption [10]) bei Wellenlängen unter 225 mμ, während gesättigte Laktone keine charakteristische Absorption in diesem Bereich aufweisen. Für Cedrin wurde ebenso wie für Santonin ein Maximum bei 243 mμ und ein schwächeres bei 330 mμ gefunden. Hieraus kann also geschlossen werden, daß Cedrin einen fünfgliedrigen gesättigten Laktonring enthält.

Es wird in diesem Zusammenhang auf die sehr große Ähnlichkeit der IR- und UV-Absorptionskurven von Cedrin mit denen von Santonin hingewiesen. Diese Beobachtung läßt zusammen mit den anderen Befunden den Schluß zu, daß für die bisher unbekannte Konstitution des Cedrins eine dem Santonin ähnliche Struktur in Betracht gezogen werden muß. Bruttoformel des Cedrins: $C_{15}H_{18}O_6$; berechnetes Molekulargewicht: 294,3.

---

8) O. FREHDEN, L. GOLDSCHMID, Mikrochim. Acta, **2**, 184 (1937).
9) F. CRAMER, Papierchromatographie, 4. Aufl., Verlag Chemie Weinheim (1958), S. 117.
10) W. SCHWABE, R. NEU, Arzneimittelforschung, **9**, 717 (1959).

Papierelektrophorese in drei Banden zerlegt. Mit Folinsreagenz erschienen am Pluspol eine graue, am Minuspol eine blaue und dazwischen eine rötliche Bande. Es mußten also in dem Aminosäurengemisch saure, basische und neutrale Aminosäuren vorliegen. Zur vollständigen Trennung wurden im Partridge-Gemisch aufsteigend entwickelte Chromatogramme quer zur Laufrichtung in Streifen geschnitten und in zweiter Richtung in saure, neutrale und basische Verbindungen durch Elektrophorese zerlegt.

Durch Besprühen mit Folinsreaganz zeigten die einzelnen Flecke charakteristische Färbungen und konnte so endgültig indentifiziert werden. Demnach sind in den Samen der Simaba cedron Pl. außer Leucin und Methionin die freien Aminosäuren Prolin, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin vorhanden.

5. Chromatographischer Nachweis von Pflanzensäuren im wässerigen Cedronextrakt.

Zur Anreicherung der Pflanzensäuren wurde eine Säule des stark basischen Anionenaustauschers Dowex 2 [15]) verwendet und mit Ammoniumkarbonatlösung eluiert. Aus der wässerigen Lösung der Ammoniumsalze schied sich nach Zugabe von Äthanol eine weißliche Kristallmasse ab. Durch Umkristallisieren aus wässerigem Methanol wurden farblose, nadelförmige Kristalle erhalten, die als Ammonoxalat [16]) indentifiziert werden konnten.

Die wässerige Lösung, in der die Pflanzensäuren als ein Gemisch der Ammoniumsalze vorlagen, wurde in Äthanol/Ammoniak/Wasser 80/4/16 chromatographiert und die Chromatogramme nach SCHWEPPE [17]) mit Anilinglukose behandelt. Es bildeten sich fünf braune Flecken, welche die gleichen Rf-Werte zeigten wie Oxalsäure 0,0, Zitronensäure Rf 0,08, Äpfelsäure Rf 0,16, Fumarsäure Rf 0,24. In dem ammoniakalischen Fließmittel konnten also aufsteigend nur kleine und deshalb uncharakteristische Rf-Werte erzielt werden. Deshalb wurde die wässerige Lösung, in der die Pflanzensäuren als ein Gemisch der Ammoniumsalze vorlagen, mit Salzsäure versetzt und mit Äther erschöpfend extrahiert. In dem Ätherextrakt waren durch Chromatographieren im Partridge-Gemisch und in Butanol/Ameisensäure/Wasser 10/3/10 fünf Säuren nachweisbar, nämlich Fumarsäure, Säure B, die nur in dem letztgenannten Lösungsmittel abgetrennt wurde, Säure C, Äpfelsäure und Zitronensäure. Die Oxalsäure ging also nicht in den Ätherextrakt über. Die Fumarsäure gab sich auch vor dem Besprühen mit Anilinglukose beim Betrachten der Chromatogramme im UV-Licht als dunkler Fleck gegen den hell fluoreszierenden Hintergrund zu erkennen.

6. Anwendung chemischer Mikromethoden zum Nachweis von Pflanzensäuren.

Als Salz der Oxalsäure konnten die bei 230° schmelzenden Kristalle nachgewiesen werden:

a) nach Reduktion zur Glykolsäure durch Rotfärbung mit Dioxynaphthalin [18]),

---

15) Dowex 2, Dow. Chem. Corp. Midland, Mich.

16) siehe Abschnitt 6.

17) H. SCHWEPPF, Dissertation Münster 1954, zit. n. F. CRAMER, Papierchromatographie, 4. Aufl. Verlag Chemie Weinheim (1958), S. 156.

18) F. FEIGL, Spot Tests, II Organic Applications, Elsevier Amsterdam-London-New York (1954), S. 256.

b) nach Überführen in Glyoxalsäure durch Rotfärbung bei Gegenwart von Phenylhydrazin und Wasserstoffperoxyd [19])

c) durch Bildung von Anilinblau nach Behandeln mit sirupöser Phosphorsäure und Diphenylamin [20]).

Äpfelsäure wurde im Ätherextrakt nachgewiesen durch Erhitzen mit β-Naphtholschwefelsäure, wobei im UV eine charakteristische blaue Fluoreszenz auftrat [21]).

Zitronensäure wurde im Ätherextrakt nachgewiesen als das im UV intensiv blau fluoreszierende Ammoniumsalz der Citrazinsäure [22])

7. Prüfung auf Quassiin im alkoholischen Extrakt der Simaba cedron.

Die empfindliche Probe auf Anwesenheit von Quassiin mit Phloroglucinsalzsäure [23]) verlief negativ. Somit enthalten die Samen der Simaba cedron kein Quassiin.

8. Durch vergleichende Untersuchung der Cotyledonen von Cedronia granatensis Cuatr. wurde festgestellt, daß sie dieselben Aminosäuren wie die Samen der Simaba cedron enthalten; es fehlt allerdings die Asparaginsäure.

D. Zusammenfassung

Es wurde eine neue und sichere Methode zur Gewinnung des kristallinen Bitterstoffes Cedrin beschrieben.

Die Untersuchung des Cedrins ergab entgegen den bisherigen Annahmen mit Sicherheit, daß Cedrin kein Glykosid ist.

Es wurde nachgewiesen, daß Cedrin einen fünfgliederigen gesättigten Laktonring besitzt.

Als weitere funktionelle Gruppen wurden zwei OH und eine (C)-CH_3-Gruppe gefunden.

Der alkalische oxydative Abbau des Cedrins führte zu Phthalsäure. Als Arbeitshypothese wurde eine Strukturformel für das Cedrin vorgeschlagen, die ein teilweise hydriertes Naphthalinringsystem besitzt und die Analogien zur Satoninformel zeigt.

Folgende Inhaltsstoffe der Simaba cedron Pl. wurden neu aufgefunden: 7 Aminosäuren: Leucin, Methionin, Prolin, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin.

4 Pflanzensäuren: Oxalsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure und Fumarsäure.

In den Samen der Cedronia granatensis wurden gefunden: Leucin, Methionin, Prolin, Alanin, Glutaminsäure und Lysin.

---

19) siehe Anmerkung 1, ebenda S. 255.
20) F. FEIGL, O. FREHDEN, Mikrochemie, **18**, 272 (1935).
21) siehe Anmerkung 1, ebenda S. 259.
22) F. FEIGL, V. ANGER, Mikrochemie, **17**, 35 (1935).
23) G. FRERICHS, G. ARENDS, H. ZÖRNIG, Hagers Handbuch d. Pharm. Praxis, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1949), II. S. 1337.